雄性大鼠交配前后尿蛋白质组的比较

王海彤 [1]，赵晨阳 [2]，高友鹤 [1]*

[1]（北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室

北京 100875）

摘要

目的：探究雄性大鼠交配当天与交配前、交配隔天与交配当天的差异是否可以通过尿液蛋白质组来反映。

方法：收集 Sprague-Dawley 雄性大鼠交配前、交配当天和交配隔天的尿液样品，通过高效液相色谱串联质谱联用（LC-MS/MS）的非标记定量蛋白质组学技术进行鉴定。筛选尿液蛋白质组的差异蛋白进行蛋白质功能分析；筛选尿液蛋白质组的差异翻译后修饰进行分析。

结果：大鼠交配当天与交配前尿液蛋白质组比较，可以鉴定到 9 个差异蛋白，其中有蛋白与精卵结合、儿茶酚胺神经递质代谢相关；大鼠交配隔天与交配当天尿液蛋白质组比较可以鉴定到 54 个差异蛋白，其中近三分之二的差异蛋白与精子发生相关。大鼠交配当天与交配前尿液蛋白质组翻译后修饰比较，可以鉴定到 45 处差异，其中有些差异修饰所在的蛋白与雄激素受体信号通路相关；大鼠交配隔天与交配当天尿液蛋白质组翻译后修饰比较，可以鉴定到 53 处差异，其中有些差异修饰所在的蛋白与雄激素受体信号通路相关。

结论：尿液蛋白质组具有反映交配行为对机体刺激、精子生成过程的潜力。相对于通过收集精液进行精子发生的研究，尿液蛋白质组可以在不干扰精子发生过程的情况下监测精子发生的过程。

关键词：尿液蛋白质组 交配 受精 精子发生

Comparison of the urine proteome in male rats before and after mating

Haitong Wang[1] Chenyang Zhao[2] Youhe Gao[1]*

[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences，Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract

Objective: To explore whether the differences in male rats on the day of mating compared with before mating, and on the next day of mating compared with on the day of mating can be reflected by the urine proteome.

Methods: Urine samples of Sprague-Dawley male rats were collected before mating, on the day of mating, and on the next day of mating. Identification was carried out through the label-free quantitative proteomics technology of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The differential proteins in the urine proteome were screened for protein function analysis, and the differential post-translational modifications in the urine

---

基金项目：中国国家重点研发计划（2023YFA1801900），北京自然科学基金（L246002），北京师范大学（11100704）

作者简介：1.王海彤.（一作）（2000.4—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物。2.赵晨阳.（二作）（1998.03—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物。

通信联系人：高友鹤（1964.06—），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

proteome were screened for analysis.
Results: When comparing the urine proteome of rats on the day of mating with that before mating, 9 differential proteins could be identified, among which some proteins were related to sperm-egg binding and catecholamine neurotransmitter metabolism. When comparing the urine proteome of rats on the next day of mating with that on the day of mating, 54 differential proteins could be identified, and nearly two-thirds of the differential proteins were related to spermatogenesis. When comparing the post-translational modifications of the urine proteome of rats on the day of mating with that before mating, 45 differences could be identified, and some of the proteins with differential modifications were related to the androgen receptor signaling pathway. When comparing the post-translational modifications of the urine proteome of rats on the next day of mating with those on the day of mating, 53 differences could be identified, and some of the proteins with differential modifications were related to the androgen receptor signaling pathway.
Conclusion: The urine proteome has the potential to reflect the stimulation of the body by mating behavior and the process of spermatogenesis. Compared with conducting research on spermatogenesis by collecting semen, the urinary proteome can monitor the process of spermatogenesis without interfering with it.
Keywords: Urinary proteome; Mating; Fertilization; Spermatogenesis

1 引言

雄性交配是受到脑神经回路控制的先天性行为，可以在没有先前经验的情况下进行。神经回路能够通过释放多巴胺控制男性的性冲动和奖励[59]。精子发生是精原细胞经过增殖分化形成成熟精子的过程，涉及到染色体倍数减半和细胞形变。旁分泌、自分泌和内分泌通路都有助于该过程的调节，参与调节的大量结构元件和化学因子使得在精子发生过程中连接各种细胞活动的网络是难以想象的复杂[1]。尿液是血液经肾脏过滤所产生，用以排除代谢废物，不受内环境稳态调节机制的控制，能更敏感地保留机体产生的各种微小变化[2]。已有研究表明，尿液代谢组可用于区分正常精子不育症男性和有生育能力的男性[3]。但是尚未有研究通过尿液蛋白质组对交配行为、精子发生进行监测。雄性大鼠一次交配，不仅脑中相关神经回路受到刺激，而且成熟精子经过消耗，也能对睾丸的精子发生造成刺激，本研究通过收集大鼠交配前、交配当天和交配后隔天的尿液样本，对尿液蛋白质组进行比较研究，尝试探索交配行为、精子发生过程是否能够在尿液蛋白质组中反映。

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

10 周龄 Sprague-Dawley 雄性大鼠 5 只，10 周龄 Sprague-Dawley 雌性大鼠 5 只，购于北京维通利华实验动物生物技术有限公司。所有大鼠在标准环境中饲养（室温（22±1）°C，湿度 65%-70%）。将所有大鼠在新环境中饲养三天后开始实验，一切实验操作遵循北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准，批准编号为 CLS-AWEC-B-2022-003。

2.2 实验方法

2.2.1 大鼠合笼

雄鼠与雌鼠以 1：1 比例于 16：00 合笼，次日 7：00 对雌鼠进行检栓，检出阴栓者视为雌雄鼠交配。

2.2.2 尿液样本收集

雄鼠于 20：00 至次日 8：00 收集尿液；收尿后雄鼠与雌鼠合笼，交配当日 20：00 至次日 8：00 收集尿液，暂存于-80℃冰箱，为交配当天尿液样本；收尿后雄鼠单独饲养，20：00 至第二日 8：00 继续收集尿液，暂存于-80℃冰箱，为交配隔天尿液样本。

2.2.3 尿液样本处理

尿蛋白提取：-80℃冰箱中取出大鼠尿液样本， 4°C 的条件下解冻。4℃，12000×g 离心 30 min，取 2 mL 上清液，每 500 μL 上清液于 2 mL 离心管中，加入三倍体积的预冷无水乙醇，上下颠倒轻柔混匀，-20°C 沉淀过夜蛋白。过夜沉淀的混合液 4°C，12000×g 离心 30 min，弃上清，等待乙醇挥发干燥。将蛋白沉淀重悬于裂解液中(含 8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，25 mmol/L 二硫苏糖醇，50 mmol/L Tris)。 4°C， 12000×g 离心 30 min，取上清于新的 1.5 mL 离心管内，获得尿液蛋白质。用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

尿蛋白酶切：取 100 μg 尿液蛋白质样品于 1.5 mL 离心管中，加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液使总体积为 200 μL。加入 20 mM 二硫苏糖醇溶液（Dithiothreitol, DTT, Sigma），涡旋混匀，金属浴 97°C 加热 10 min，冷却至室温。加入 50 mM 碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma），涡旋混匀，室温避光反应 40 min。 取 10 kDa 超滤管(Pall, Port Washington, NY, USA) 向滤膜上加入 200 μL UA 溶液 (8 mol/L 尿素，0.1 mol/L Tris-HCl，pH 8.5)洗涤滤膜，18°C，14000×g 离心 5 min，弃去下层滤液，重复一次；向滤膜上加入碘乙酰胺处理完成后的尿液蛋白质样品，18℃，14000×g 离心 30 min，弃去下层滤液，尿液蛋白质留在滤膜上；向滤膜中加入 200 μL UA 溶液洗涤尿液蛋白质，18°C，14000×g 离心 30 min，重复两次；向滤膜中加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液洗涤尿液蛋白质，18°C，14000×g 离心 30 min，重复两次；按胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行酶切，37°C 水浴 15 h。酶切结束后 4℃，13000×g 离心 30 min 收集滤液，该滤液为多肽混合液。将多肽混合液通过 HLB 固相萃取柱(Waters，Milford，MA)进行除盐，使用真空干燥仪冻干，于-20°C 条件下保存。

2.2.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

0.1%甲酸溶解多肽混合液冻干，使用 BCA 试剂盒对肽段进行定量，将肽段浓度稀释为 0.5 μg/μL。每个样品取 6 μL 混匀，使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。离心收集 10 份流出液（Fractions），使用真空干燥仪冻干后用 0.1%甲酸复溶。以对 10 份流出液和全部单个样品以样品 : iRT 体积比为 10 : 1 的例加入 iRT 试剂(Biognosys, Switzerland)，以校准提取的肽峰的保留时间。

10 份流出液使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)进行分离，分离的肽段经过 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)以 Data Dependent Acquisition(DDA)模式进行质谱分析并采集数据，生成 10 份 raw 文件，导入 Proteome Discoverer 软件采用 Swiss-iRT 和 Uniprot-Rat 数据库进行建库分析（version 2.0, Thermo Scientific）。根据建库结果设定单个样品 Data Independent Acquisition(DIA)模式的 39 个可变窗口建立 DIA 方法。单个样品取 1 μg 肽段，使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)进行分离，分离的肽段经过 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)以 DIA 模式进行质谱分析，采用新建立的 DIA 方法进行 DIA 采集数据，生成 raw 文件。

2.2.5 Label-free DIA 定量分析

将 DIA 模式下采集的单个样品 raw 文件导入 Spectronaut Pulsar(Biognosys AG, Switzerland)软件进行分析。由 MS2 中各片段离子的峰面积相加，计算肽段丰度。由各自的肽段丰度相加计算蛋白质丰度。每个样本进行 3 次技术重复。

2.2.6 Open-pFind 非限定性修饰搜索

pFind Studio 软件（版本 3.2.1，中国科学院计算技术研究所）对每个样本的 3 次技术重复进行非限定性修饰搜索，使用默认的参数设置。数据库从 UniProt 下载的 Rattus norvegicus 数据库（更新至 2024 年 9 月）。仪器类型为 HCD-FTMS，胰蛋白酶，酶全特异性，最多有 2 个漏切位点。Precursor mass tolerance ±20 ppm，Fragment mass tolerance ±20 ppm，选择开放搜索。筛选条件为错误发现率（FDR）在肽水平＜1%。

2.2.7 蛋白数据分析

每个样本的 3 次技术重复，取平均值进行统计学分析。本实验进行前后对比，将交配当天与交配前进行比较，筛选差异蛋白。差异蛋白筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥1.5 或≤0. 67，双尾配对 t 检验分析的 P 值＜0.05；将交配隔天和交配当天进行比较，筛选差异蛋白。差异蛋白筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥1.5 或≤0. 67，双尾配对 t 检验分析的 P 值＜0.05。筛选到的差异蛋白通过 Uniprot 网站（https://www.uniprot.org/）分析，并在 Pubmed 数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov）中检索相关文献，对差异蛋白进行功能分析。

2.2.8 蛋白翻译后修饰数据分析

Open-pFind 非限定性修饰搜索后获得每个样本的翻译后修饰 PROTEIN 文件。在 GitHub 平台（https://github.com/daheitu/scripts_for_pFind3_protocol.io）下载 Python 脚本 pFind_protein_contrast_script，用于汇总不同样本的翻译后修饰鉴定结果，即 PROTEIN 文件[60]。将交配当天与交配前进行比较，筛选差异修饰。筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥1.5 或≤0. 67，双尾配对 t 检验分析的 P 值＜0.05；将交配隔天和交配当天进行比较，筛选差异修饰。筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥1.5 或≤0. 67，双尾配对 t 检验分析的 P 值＜0.05。对差异修饰所在蛋白通过 Uniprot 进行分析。

3 实验结果与分析

3.1 大鼠交配当天与交配前尿液蛋白质组比较

3.1.1 差异蛋白

将交配当天与交配前尿液蛋白质进行比较，筛选差异蛋白条件为：FC≥1.5 或≤0.67，双尾配对 t 检验 $P<0.05$。结果表明，交配当天与交配前相比，可以鉴定到 9 个差异蛋白，将差异蛋白按 FC 由大到小的顺序排列，通过 Uniprot 进行检索，结果如表 1 所示。

表 1 交配当天与交配前大鼠尿液蛋白质组差异蛋白

Uniprot ID	Protein names	Fold change	Trend	P value
Q62795	Sodium-dependent phosphate transport protein 1	2.19	↑	2.11E-02
P02625	Parvalbumin alpha	2.19	↑	1.50E-02
P06399	Fibrinogen alpha chain	1.66	↑	2.81E-02
Q8CG45	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	0.59	↓	3.90E-02
P62959	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	0.55	↓	1.04E-02

Q924B5	Testis-expressed protein 101	0.55	↓	6.35E-03
P22734	Catechol O-methyltransferase	0.53	↓	4.93E-03
P48037	Annexin A6	0.41	↓	1.16E-02
P46844	Biliverdin reductase A	0.38	↓	3.57E-02

3.1.2 差异蛋白功能分析

将鉴定到的 9 个差异蛋白经 Uniprot 检索其功能和生物学过程。其中有蛋白与受精、神经递质代谢相关。

Testis-expressed protein 101 通过控制精子与透明带的结合以及精子向输卵管的迁移在受精中起作用；参与到精子与透明带结合、受精、有鞭毛的精子运动等生物学过程中。

Catechol O-methyltransferase 催化儿茶酚胺神经递质和儿茶酚激素的 O - 甲基化，从而使其失活；缩短某些神经活性药物（如左旋多巴、α - 甲基多巴和异丙肾上腺素）的生物半衰期。其中儿茶酚胺神经递质是一类在人体中具有重要生理功能的神经递质，主要包括去甲肾上腺素（norepinephrine）、肾上腺素（epinephrine）和多巴胺（dopamine）。在交配过程中，大脑会释放多巴胺，产生愉悦感和满足感。

3.2 大鼠交配隔天与交配当天尿液蛋白质组比较

3.2.1 差异蛋白

将交配隔天与交配当天尿液蛋白质进行比较，筛选差异蛋白条件为：FC≥1.5 或≤0.67，双尾配对 t 检验 P<0.05。结果表明，交配隔天与交配当天相比，可以鉴定到 54 个差异蛋白，将差异蛋白按 FC 由大到小的顺序排列，通过 Uniprot 进行检索，结果如表 2 所示。

表 2 交配隔天与交配当天大鼠尿液蛋白质组差异蛋白

Uniprot ID	Protein names	Fold change	Trend	P value	Related to implantation
Q8R431	Monoglyceride lipase	13.75	↑	1.18E-02	7
P0C0A1	Vacuolar protein-sorting-associated protein 25	8.48	↑	3.99E-02	8
Q63531	Ribosomal protein S6 kinase alpha-1	7.8	↑	4.51E-02	9 10
Q63060	Glycerol kinase	4.87	↑	9.32E-03	11
P63259	Actin, cytoplasmic 2	4.5	↑	3.53E-02	12 13 14
P63095	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	3.75	↑	2.19E-02	15 16
Q62753	Syntaxin-binding protein 2	3.63	↑	0.044062	17
P04897	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	3.6	↑	4.16E-02	18 19
Q2QDE7	Deoxyribonuclease-1-like 1	3.09	↑	0.037949	20
Q6PCU2	V-type proton ATPase subunit E 1	3.07	↑	7.32E-03	21 22
Q9Z0W7	Chloride intracellular channel protein 4	2.92	↑	3.59E-02	23
P06866	Haptoglobin	2.73	↑	3.80E-02	24 25
P61983	14-3-3 protein gamma	2.65	↑	0.019226	26
P04692	Tropomyosin alpha-1 chain	2.41	↑	0.01404	27
P03994	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	2.35	↑	0.032237	28
Q6MG61	Chloride intracellular channel protein 1	2.34	↑	2.44E-02	23

Q6P9T8	Tubulin beta-4B chain	2.33	↑	4.48E-02	29 30
Q497B0	Omega-amidase NIT2	2.24	↑	3.07E-02	
Q99PW3	Sialidase-1	2.23	↑	0.035028	
Q811X6	Lambda-crystallin homolog	2.18	↑	0.046418	
Q3KRD8	Eukaryotic translation initiation factor 6	2.12	↑	0.027884	31
Q4KM73	UMP-CMP kinase	2.04	↑	0.024033	
Q811M5	Complement component C6	2.04	↑	2.98E-02	
Q9EPB1	Dipeptidyl peptidase 2	2.04	↑	0.00621	32 33
P50399	Rab GDP dissociation inhibitor beta	2.03	↑	3.24E-02	34
Q9Z173	Adhesion G protein-coupled receptor L3	2.01	↑	0.033569	
P51635	Aldo-keto reductase family 1 member A1	1.94	↑	5.39E-03	35 36
Q6DGG1	Protein ABHD14B	1.94	↑	1.46E-02	
Q5XHZ9	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	1.9	↑	9.31E-03	37 38
Q5XFX0	Transgelin-2	1.86	↑	4.20E-02	39 40
Q32KJ6	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	1.85	↑	1.68E-02	
P51607	N-acylglucosamine 2-epimerase	1.84	↑	4.69E-02	
Q5FVH2	Phospholipase D3	1.82	↑	0.015003	41 42
P08689	Sex hormone-binding globulin	1.80	↑	0.006293	43 44 45
P32755	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	1.78	↑	0.026115	
Q6TMA8	Angiopoietin-related protein 4	1.78	↑	0.040734	
Q920A6	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	1.74	↑	1.97E-03	
Q5M843	2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain-containing protein 3	1.65	↑	0.049558	
Q5M7T9	Threonine synthase-like 2	1.64	↑	4.00E-03	
Q568Z6	IST1 homolog	1.62	↑	0.049048	
Q66H12	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	1.61	↑	0.037511	
Q6TUD4	Protein YIPF3	1.61	↑	0.041193	
P63102	14-3-3 protein zeta/delta	1.6	↑	4.71E-02	46 47
P35704	Peroxiredoxin-2	1.58	↑	3.22E-02	48 49
Q6VBQ5	Myeloid-associated differentiation marker	1.58	↑	0.044019	
B0BND0	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6	1.57	↑	4.42E-02	
Q5U2P2	Immunoglobulin superfamily member 11	1.57	↑	7.04E-03	
P10111	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1.56	↑	3.94E-02	50
P19804	Nucleoside diphosphate kinase B	1.54	↑	3.45E-02	51 52
P17046	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	1.52	↑	0.018791	53 54
P47820	Angiotensin-converting enzyme	1.52	↑	0.001539	55 56
Q642A7	Protein FAM151A	1.51	↑	1.65E-02	
Q6AYR9	Tetraspanin-1	0.60	↓	0.003997	57
P02625	Parvalbumin alpha	0.4	↓	1.37E-02	58

3.2.2 差异蛋白功能分析

将鉴定到的 54 个差异蛋白经过 PubMed 数据库进行文献检索，检索后发现其中 33 个蛋白或其家族其他成员被报道与精子发生相关。

Monoglyceride lipase 在睾丸中高度表达，作为内源性大麻素系统的一部分直接参与调节人类睾丸生理学，包括精子发生和间质细胞的功能[7]。

Vacuolar protein-sorting-associated protein 25 同一家族的 Vacuolar protein-sorting-associated protein 33 B 突变的秀丽隐杆线虫不育，具有分裂停滞的精母细胞，表明该蛋白参与精子特异性细胞器的形成[8]。

Ribosomal protein S6 kinase alpha-1 的底物 Ribosomal protein S6 对精子发生至关重要，在中华鲷中敲低该蛋白会导致精子发生缺陷，包括生殖细胞丢失、成熟精子滞留和空腔形成[9]。该蛋白还能通过 Akt1/2 调节支持细胞血液-睾丸屏障，进而调节 F-肌动蛋白的组织，调节细胞间界面的粘附功能，促进大鼠精子发生过程中前细线期精母细胞血液-睾丸屏障的转运[10]。

与 Glycerol kinase 具有高度同源性的 Glycerol kinase 2，在小鼠精子发生过程中对于新月状线粒体正确排列以形成线粒体鞘至关重要，敲除该基因将导致精子鞭毛线粒体鞘紊乱[11]。

Actin 与精子发生过程中的各个方面有关，随着精子发生，Actin 细胞骨架在此过程中表现出主动重塑，参与精子细胞的塑造和分化[12 13]。然而，Actin 细胞骨架组织响应生精上皮细胞精子发生过程的分子机制在很大程度上仍未被探索[14]。

在公羊的生殖器官中，Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha 以组织特异性和年龄依赖性方式表达，该蛋白在附睾中高水平表达，表明其可能影响附睾管腔液的组成，从而影响精子成熟的微环境，在公羊生殖系统中的精子发生以及睾丸和附睾的发育中可能发挥重要作用[15]。Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha 同家族的 Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha，在大鼠粗线期精母细胞中高水平表达，表明其可能在精子发生的这个阶段发挥作用[16]。

支持细胞中的 Syntaxin-binding protein 2 通过直接与新生小鼠睾丸中的 connexin 43 相互作用来调节精原干细胞的维持。支持细胞和生殖细胞之间的相互作用，对精子发生和男性生育至关重要[17]。

在小鼠精母细胞和精子细胞中检测到 Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1、Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2、Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-3 和 Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha。当精母细胞发育成精子细胞时，Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 水平降低[18]。Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit 与发育中的顶体的关联，可能在顶体生物发生中发挥作用；Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit 存在于哺乳动物精子的顶体区域，并且是信号转导引起顶体胞吐作用所需的复合物的一部分[18 19]。

Deoxyribonuclease-1 与细胞凋亡调节有关，该蛋白的精浆水平，对正确的精子发生很重要。与无精索静脉曲张的青少年相比，精索静脉曲张的青少年 Deoxyribonuclease-1 水平降低，Deoxyribonuclease-1 水平与精子浓度和形态呈正相关。此外，Deoxyribonuclease-1 能够区分导致精液质量改变的精索静脉曲张和不导致精液质量改变的精索静脉曲张[20]。

V-type proton ATPases 在兔精子获能过程中起着重要作用[21]。大鼠圆形精子细胞通过 V-type proton ATPases、HCO_3^- 进入途径、Na^+/HCO_3^-依赖性转运系统和假定的质子传导途径调节 细胞内 pH。这些 pH 调节似乎是专门为承受酸挑战而设计的[22]。

牛附睾精子中存在 Chloride intracellular channel protein。Chloride intracellular channel protein 1、Chloride intracellular channel protein 4 和 Chloride intracellular channel protein 5 均存在于精子中，并在细胞内占据着不同的位置。它们都能够与精子中的 PP1γ2 结合，鉴于 PP1γ2 是调节精子活力的关键酶，作为 PP1γ2 结合蛋白的 Chloride intracellular channel

protein 可能在精子功能中发挥重要作用[23]。

Haptoglobin 是一种铁转运蛋白，在大鼠睾丸的支持细胞、间质细胞和生殖细胞中表达，但在附睾中没有表达，可能在睾丸的铁代谢中发挥重要作用。睾丸 Haptoglobin mRNA 水平在出生后的成熟过程中稳步升高，表明其参与精子发生[24]。支持细胞在精子发生中起着关键作用，表达精子发生的主要激素调节剂促卵泡激素（FSH）和睾酮（T）的受体。FSH 刺激猪的支持细胞后，支持细胞外囊泡中抑制素-α、抑制素-β、斑珠蛋白、触珠蛋白、D-3-磷酸甘油酸脱氢酶和钠/钾转运 ATP 酶的增加[25]。

在体外实验和小鼠体内的实验中，14-3-3 protein gamma 的缺失导致桥粒形成减少和细胞-细胞粘附减少，导致睾丸组织和精子发生缺陷[26]。

在精子发生过程中，精子发生的稳定的 F-actin 锥体含有 Tropomyosin 1，并且 F-actin 锥体的形成失败与 Tropomyosin 1 在锥体起始位点的积累失败有关[27]。

在雄性家禽 Anas platyrhynchos 中 Hyaluronan and proteoglycan link protein 2 的基因被认定为是调控生殖能力的候选基因[28]。

精子发生中的许多过程依赖于细胞骨架的动态变化、细胞器运动，特别是微管的调节。来自转基因小鼠模型的数据表明，微管动力学的协调对于男性生育能力至关重要[29]。在精子发生过程中，一种称为"nuage"的结构随着精子发生细胞的分化而出现和消失。nuage 可以分为 Irregularly Shaped Perinuclear Granule (ISPG)、Intermitochondrial Cement (IMC)、Satellite Body (SB)和 Chromatoid Body (CB)四种类型。ISPG，IMC 和 SB 在粗线期精母细胞中观察到，而 CB 在圆形精子细胞中观察到。大鼠圆形精子细胞中，Tubulin beta 从 CB 中储存的 mRNA 翻译得到，在 CB 外与 Tubulin alpha 组装形成微管的结构单元：αβ-异二聚体，来构建精子鞭毛中的微管[30]。

在果蝇中，Eukaryotic translation initiation factor 4E-5 对雄性生殖能力至关重要。Eukaryotic translation initiation factor 4E-5 定位于细长精子囊的远端，Eukaryotic translation initiation factor 4E-5 突变体在减数分裂后阶段表现出缺陷，包括精子囊极化的轻度缺陷。Eukaryotic translation initiation factor 4E-5 突变体在精子个体化方面也存在完全渗透性缺陷，导致无法产生成熟精子[31]。

人类睾丸周管细胞运输精子，有助于精原干细胞的生态位和免疫监测。分泌组分析发现人类睾丸周管细胞复制性衰老，Dipeptidyl peptidase 4 水平升高，这可能在精子发生中起作用，睾丸 Dipeptidyl peptidase 4 可能进一步代表一个可能的药物靶点[32]。Dipeptidyl peptidase 4 抑制剂是一类新的抗糖尿病化合物，临床过程中会影响精子发生，导致患者精液质量急剧恶化[33]。

Rab GDP dissociation inhibitor beta 同家族成员 Rab GDP dissociation inhibitor alpha 参与肌动蛋白细胞骨架的组织，也调节细胞形态和细胞运动，该蛋白的表达在弱精子症患者降低[34]。

在睾丸发育过程中代谢特定类固醇的能力增加，如家猫睾丸发育过程中 Aldo-keto reductase family 1 member A1 同家族成员 Aldo-keto reductase family 1 member C3 的表达升高[35]。家蚕睾丸中 Aldo-Keto Reductase mRNA 水平高于其他组织，在家蚕精子发生中起着重要作用[36]。

Pachytene checkpoint protein 2 homolog 通过 Uniprot 数据库检索显示，该蛋白在男性生殖细胞核中表达，参与精子发育、精子形成、雄性减数分裂、联会复合体、减数分裂重组、双链断裂修复、减数分裂重组检查点信号通路等生物学过程。在减数分裂过程中染色体重组和染色体结构发育中起关键作用。在减数分裂重组的早期介导非交叉途径，还通过影响交叉和非交叉途径来有效地完成同源染色体联会，为性染色体的有效联会所必需。小鼠 Pachytene checkpoint protein 2 是减数分裂过程中重组和正常高阶染色体结构所必需的。

Pachytene checkpoint protein 2 在减数分裂，双链断裂的非交叉修复发挥潜在作用。该基因纯和突变的雄性小鼠精母细胞染色体能完全联会，但是在染色体重组过程中，因为该的缺失导致双链断裂修复缺陷无法修复，细胞在粗线期死亡，睾丸组织缺乏减数分裂后细胞[37 38]。在男性中，Pachytene checkpoint protein 2 是性染色体联会和性体(X 染色体和 Y 染色体形成的转录沉默的亚核结构域)形成所必需的[38]。

急性热应激会损害鸡睾丸中翻译、蛋白质折叠和蛋白质降解过程，从而导致细胞凋亡并干扰精子发生，经历急性热应激后，睾丸中 Transgelin 上调抵御热诱导的损伤[39]。老年动物睾丸组织中 Transgelin 基因的表达水平较低[40]。

Phospholipase D6 是粗线期精母细胞和发育中精子细胞的高尔基体定位蛋白，其在高尔基体中的特异性分布可能与该细胞器在精子发生过程中的特定功能有关[41]。Phospholipase D 同工酶参与了小鼠睾丸的精子发生过程[42]。

Sex hormone-binding globulin 通过 Uniprot 检索其功能是作为雄激素转运蛋白，每个二聚体结合一个类固醇分子。专门针对 5-二氢睾酮，睾酮和 17-雌二醇。通过控制类固醇激素的血浆浓度来调节其血浆代谢清除率。参与到原代精细胞生长的生物过程中。犬睾丸 Sex hormone-binding globulin 的表达与精子浓度、总活力和进行性活力、质膜完整性和顶体完整性呈正相关，与精子线粒体活性低呈负相关。在附睾中，Sex hormone-binding globulin 的表达仅与精子质膜完整性呈正相关。睾丸和附睾中 Sex hormone-binding globulin 表达和形态正常细胞有关。Sex hormone-binding globulin 在精子发生和精子成熟中起着关键作用，对男性生殖成功至关重要[43]。附睾尾是大鼠精子的主要储存区，其雄激素供应是精子生存所必需的，由脉管系统提供，并依赖睾酮通过基质组织扩散到上皮细胞。基质 Sex hormone-binding globulin 在附睾精子储存区的雄激素供应中发挥作用[44]。精子 Sex hormone-binding globulin 亚型水平与年龄和精子活力显著相关，并可能影响与男性生育能力相关的精子功能[45]。

14-3-3 protein 在有丝分裂和减数分裂中都起着关键的调节作用。在小鼠中 14-3-3 protein epsilon 对正常的精子功能和男性生育能力至关重要[46]。成熟精子细胞需要从其附着的支持细胞上释放，目前鉴定到参与支持细胞和成熟精子细胞之间粘附的蛋白质包括 14-3-3 protein zeta/delta，该蛋白仅出现在精子释放过程中的小管段裂解液中。但是其在精子发生过程中的确切作用是什么，它是如何与睾丸中的其他信号转导途径相互作用或影响的现在仍然未知[47]。

Peroxiredoxin-2 具有一些抗氧化特性，可能参与维持小鼠精子发生环境的氧化平衡[48]。Peroxiredoxin-2 也可以维持新生大鼠生殖细胞的正常发育[49]。

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A 在环境雌激素处理小鼠的睾丸中表达上调，环境雌激素会减少男性精子数量，导致男性不育，然而其对男性不育影响的分子机制尚不清楚[50]。

Nucleoside diphosphate kinase B 分布于精子的 manchette 微管结构（细长精子中短暂出现的微管结构，其在核浓缩和精子尾部形成中发挥重要作用）。Nucleoside diphosphate kinase A 瞬时分布于圆形精子细胞核中，不对称分布在细长精子细胞核基极的细胞质中。Nucleoside diphosphate kinase 亚型可能在人类精子发生和鞭毛运动的磷酸转移网络中具有特定功能[51]。Nucleoside diphosphate kinase 通过增加小鼠细胞内抗氧化酶谷胱甘肽过氧化物酶 5 的水平以消除活性氧，在精子发生中起着关键作用[52]。

编码 Lysosome-associated membrane protein-2 的基因 LAMP2 是 Fork head box J2 的靶点。小鼠睾丸生精细胞中 Fork head box J2 的过度表达通过上调 lysosome-associated membrane protein 2A 影响伴侣介导的自噬，导致减数分裂开始时精子发生失败，从而导致男性不育[53]。Lysosome-associated membrane protein-1 在精子发生的后期(顶体期)表达，而 Lysosome-associated membrane protein-2 则在精子发生的整个过程中均表达[54]。

Somatic angiotensin-converting enzyme 通过调节 MAPK 依赖性细胞增殖，在精原干细胞自我更新中发挥重要作用。精原干细胞自我更新是精子发生不可缺少的一部[55]。同样，睾丸

血管紧张素转换酶在男性生育中起着关键作用。缺乏睾丸血管紧张素转换酶活性的小鼠精子中 ATP 比正常小鼠精子低 9.4 倍。ACE 抑制剂也可将小鼠精子中的 ATP 生成减少 72%。tACE 失活严重影响氧化代谢，精子显示出较低水平的氧化酶，导致线粒体呼吸速率降低。缺乏睾丸血管紧张素转换酶活性的小鼠精子能量生成减少导致其生理功能缺陷，包括运动能力、顶体酶活性以及体内外受精[56]。

青春期支持细胞中 Tspan8 的自然下调是建立男性生育能力的先决条件。从青春期到成年期间，支持细胞中 Tspan8 的天然下调被特异性地阻止，成年雄性大鼠的精子数减少了约 98%[57]。

注射十一酸睾酮与口服左炔诺孕酮联合治疗增强了 Parvalbumin alpha 的表达，抑制精子发生。Parvalbumin alpha 可以防止睾丸细胞免受细胞凋亡的影响并促进细胞存活，可能是激素诱导精子发生抑制的早期分子靶标[58]。

3.3 大鼠交配当天与交配前尿液蛋白质组翻译后修饰比较

将交配当天与交配前尿液蛋白质组翻译后修饰进行比较，筛选差异修饰条件为：FC≥1.5 或≤0.67，双尾配对 t 检验 P<0.05。结果表明，交配当天与交配前相比，可以鉴定到 45 处差异修饰，按 FC 值由大到小排序，如表 3 所示。除 P02625 外，其余差异修饰所在的蛋白，在大鼠交配当天与交配前不存在差异。Uniprot 的 GO 分析中显示有些差异修饰所在蛋白 P02780、Q9JHB9 和 P02782 与类固醇结合、雄激素受体信号通路相关；Q03626 与胚胎植入相关；P98158 与雄性性腺发育相关；P05371 与精子发生相关；P48199 与对睾酮的反应相关；除此以外还有部分蛋白与神经元发育调控、突触传递相关；全部 GO 分析结果详见附件 1。

表 3 交配当天与交配前大鼠尿液蛋白质组差异修饰

Uniprot ID	Peptide	Modification	before	In	Fold change	P value
P01836	IDGSEQRDGVLDSVTDQDSK	2,Cation_Fe[II][D];	0	1.2	∞	3.88E-03
P02761	LNGDWFSIVVASNKR	2,Asn->Val[N];	0	0.8	∞	1.61E-02
P02761	NLDVAKLNGDWFSIVVASNKR	6,Xlink_DTSSP[192][K];	0	0.8	∞	1.61E-02
P02770	SFLGHYLHEVAR	1,NeuGc[S];	0	1.8	∞	2.13E-02
P02625	AIGAFTAADSFDHKK		0	1.4	∞	2.49E-02
P02761	ETFQLMVLYGR	1,Unknown_162[E];	0	2	∞	3.41E-02
P98158	QIISNLNNPR	2,Xle->Cys[I];	0	1	∞	3.41E-02
P02761	EENGSMRVFMQHIDVLENSLGFK	6,Met->Lys[M];	0	2	∞	4.74E-02
P48199	VSRSFSIFSYATK	0,Unknown_250[AnyN-term];	0.4	6	15.000	3.95E-02
P01835	DSKDSTYSMSSTLSLTK	5,Hex(1)Pent(2)[S];	0.2	1.2	6.000	3.41E-02
P01836	DSKDSTYSMSSTLSLTK	5,Hex(1)Pent(2)[S];	0.2	1.2	6.000	3.41E-02
P27274	LEIANVQYR		1	4.6	4.600	3.67E-02
P07151	IPNIEMSDLSFSK	0,ISD_z+2_ion[AnyN-term]; 3,Deamidated[N];6,Oxidation[M];	0.4	1.8	4.500	2.49E-02
P02761	VFMQHIDVLENSLGFK	0,ICPL_13C(6)2H(4)[AnyN-term];	1.2	4.8	4.000	1.45E-02
P01835	SKDSTYSMSSTLSLTK	2,Xlink_BuUrBu[213][K];	1.2	4.6	3.833	4.81E-02
P01836	SKDSTYSMSSTLSLTK	2,Xlink_BuUrBu[213][K];	1.2	4.6	3.833	4.81E-02
P07522	TTTYAAAGPPR	0,TMAB_2H(9)[AnyN-term];	0.4	1.4	3.500	3.41E-02
P02761	TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK	6,Cation_Na[E];	3.4	9.8	2.882	1.83E-02
P27274	NCLDPVSSCK	0,Unknown_306[AnyN-term]; 2,Carbamidomethyl[C];	4.2	11.6	2.762	2.57E-02

		9,Carbamidomethyl[C];				
Q63041	PLSLCALTAVDQSVLLLKPEAK	5,Carbamidomethyl[C];	0.6	1.4	2.333	1.61E-02
P36375	EPADITDGVKVIDLPTEEPK	4,Cation_Fe[III][D];	0.8	1.8	2.250	3.41E-02
P36376	EPADITDGVKVIDLPTEEPK	4,Cation_Fe[III][D];	0.8	1.8	2.250	3.41E-02
P05371	FDSDPITVVLPEEVSKDNPK	3,O-Methylphosphate[S];	0.8	1.8	2.250	3.41E-02
Q6IMF3	SLNDKFASFIDK		3.8	8	2.105	8.15E-03
P23680	ALNYEINGYVVIKPR	2,Xle->Cys[L];	8.6	16.8	1.953	1.64E-02
P23680	VGQYSLYIGNSK		7.8	13	1.667	3.10E-02
P02761	VFMQHIDVLENSLGFK	3,Met->His[M];	10.2	16.6	1.627	4.93E-02
Q6AYD4	SSQVFFGPALDTVR	0,Unknown_306[AnyN-term];	2.6	4.2	1.615	3.49E-02
P02761	VFMQHIDVLENSLGFK	4,Ethyl+Deamidated[Q];	57.8	31	0.536	1.81E-02
P02770	CYGTVLAEFQPLVEEPK	2,Tyr->Trp[Y];	7.4	3.8	0.514	1.14E-02
Q63041	GPTHHFIK		5	2.4	0.480	4.86E-02
O70244	TFNTSPGDIISPNFPK		11.2	4.8	0.429	2.99E-02
Q4QQW8	VLTILEQIPGMVVVADK		5.6	2.4	0.429	2.99E-02
P02761	FKNGETFQLMVLYGR	0,Biotin_Thermo-21330[AnyN-term];	3.2	1.2	0.375	4.74E-02
Q68FP1	ALNSNDAFVLK	0,CAF[AnyN-term];	1.2	0.4	0.333	1.61E-02
Q6IRK9	PDTDSFNTVAEITGSK	5,Pent(2)[S];	14	4.4	0.314	2.05E-02
P02770	PQVSTPTLVEAAR	5,Ethanedithiol[T];	1.6	0.4	0.250	3.27E-02
P81828	PDEICAWVVVTTR	5,Cys->Tyr[C];	6.2	1.4	0.226	3.05E-02
P81827	PDEICAWVVVTTR	5,Cys->Tyr[C];	6.2	1.4	0.226	3.05E-02
P83121	PDEICAWVVVTTR	5,Cys->Tyr[C];	6.2	1.4	0.226	3.05E-02
P98158	GFTCACPDDFQTVQLR	6,NEIAA[C];	1	0.2	0.200	1.61E-02
P02761	INFKNGETFQLMVLYGR	0,CLIP_TRAQ_4[AnyN-term];	2.6	0.4	0.154	2.95E-02
P02761	QHIDVLENSLGFK	4,UgiJoullieProGly[D];	1.6	0.2	0.125	2.49E-02
P98158	HQCLCEEGYILER	3,monomethylphosphothione[C];	2.6	0.2	0.077	9.26E-03
P01836	DGSEQRDGVLDSVTDQDSK	0,Delta_H(2)C(2)[AnyN-term];	0.8	0	0.000	1.61E-02
P02780	ICCYASGSGCSILDEVIR	3,EQAT_2H(5)[C];	0.8	0	0.000	1.61E-02
Q9JHB9	ICCYASGSGCSILDEVIR	3,EQAT_2H(5)[C];	0.8	0	0.000	1.61E-02
P02761	TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK	10,Cation_Na[E];15,Deamidated[N];	1.2	0	0.000	3.27E-02
Q03626	DTEELTYSVPYGR	5,Xle->Thr[L];	1	0	0.000	3.41E-02
Q6IE52	DTEELTYSVPYGR	5,Xle->Thr[L];	1	0	0.000	3.41E-02
P12788	RHPEYNKDTLDNDIMLIK	0,Carboxymethyl[AnyN-term];	1	0	0.000	3.41E-02
P02782	ASQICELVAHETISFLMK	0,Methyl[AnyN-term];	1	0	0.000	3.41E-02

3.4 大鼠交配隔天与交配当天尿液蛋白质组翻译后修饰比较

将大鼠交配隔天与交配当天尿液蛋白质组翻译后修饰进行比较，筛选差异修饰条件为：FC≥1.5 或≤0.67，双尾配对 t 检验 P<0.05。结果表明，大鼠交配隔天与交配当天相比，可以鉴定到 53 处差异修饰，按 FC 值由大到小排序，如表 4 所示。除 P02625 和 Q642A7 外，其余差异修饰所在的蛋白，在大鼠交配隔天与交配当天不存在差异。Uniprot 的 GO 分析中显示有些差异修饰所在蛋白 P48199 与对雌二醇和睾酮的反应相关；P02780 和 Q9JHB9 与雄激素受体信号通路相关；P12346 与细胞对促卵泡激素刺激的反应相关；P13635 与女性妊娠相关；P98158 与雄性性腺发育相关；除此以外还有少部分蛋白与神经

元发育调控；全部 GO 分析结果详见附件 2。

表 4 大鼠交配隔天与交配当天大鼠尿液蛋白质组差异修饰

Uniprot ID	Peptide	Modification	In	After	Flod change	P value
P02770	CTSFQENPTSFLGHYLHEVAR	6,UgiJoullieProGlyProGly[E];	0	1.2	∞	3.88E-03
P02761	LNGDWFSIVVASNKR	2,Asn->Phe[N];	0	1.4	∞	2.49E-02
P48199	SFSIFSYATK	1,Ser->Pro[S];	0	2.6	∞	4.86E-02
P02761	CRELYLVAYK	0,Dansyl[AnyN-term];	0.2	2	10.000	3.67E-02
P02761	NIIDLTKTDR	0,AccQTag[AnyN-term];	0.4	3.8	9.500	2.15E-02
P81828	EICAWVVVTTR	3,ICAT-C_13C(9)[C];	0.2	1.8	9.000	3.49E-02
P81827	EICAWVVVTTR	3,ICAT-C_13C(9)[C];	0.2	1.8	9.000	3.49E-02
P83121	EICAWVVVTTR	3,ICAT-C_13C(9)[C];	0.2	1.8	9.000	3.49E-02
Q62867	FFNILTVNTDGK	0,ISD_z+2_ion[AnyN-term]; 3,Deamidated[N];	0.4	3	7.500	6.99E-03
P02770	RHPDYSVSLLLR	9,Xle->Cys[L];	0.2	1.4	7.000	3.27E-02
P81828	CTSFDSTGFCHVGR	0,CAF[AnyN-term];	0.2	1.4	7.000	3.27E-02
P42854	SVLSGSEASFVSSLIK	0,SPITC_13C(6)[AnyN-term];	0.2	1.4	7.000	3.27E-02
P02770	SFQENPTSFLGHYLHEVAR	1,Biotin_Thermo-88317[S];	0.6	4.2	7.000	4.49E-02
P81828	CQTYPDEICAWVVVTTR	9,EGCG2[C];	1.8	12.4	6.889	2.31E-03
P81827	CQTYPDEICAWVVVTTR	9,EGCG2[C];	1.8	12.4	6.889	2.31E-03
P83121	CQTYPDEICAWVVVTTR	9,EGCG2[C];	1.8	12.4	6.889	2.31E-03
P12346	DSAFGLLR	1,Dehydrated[D];	0.4	2.4	6.000	3.20E-03
P07522	DTPEGLAVDWIGR	0,Carbamidomethyl[AnyN-term];	0.4	2.4	6.000	4.74E-02
Q68FP1	ALNSNDAFVLK	0,CAF[AnyN-term];	0.4	2.2	5.500	3.67E-02
Q642A7	PDADMLDYLQNIGQISHR	1,Pro->His[P];	1.2	6.4	5.333	8.74E-04
P81828	QTYPDEICAWVVVTTR	8,GG[C](Dicarbamidomethyl[C]);	0.6	2.6	4.333	3.41E-02
P81827	QTYPDEICAWVVVTTR	8,GG[C](Dicarbamidomethyl[C]);	0.6	2.6	4.333	3.41E-02
P83121	QTYPDEICAWVVVTTR	8,GG[C](Dicarbamidomethyl[C]);	0.6	2.6	4.333	3.41E-02
P02761	NGSMRVFMQHIDVLENSLGFK	1,HexNAc(2)[N];	0.6	2.6	4.333	4.74E-02
Q64240	TLPDIQVQENFNEAR	1,Hex(1)HexNAc(1)Phos(1)[T];	0.4	1.6	4.000	3.88E-03
P81828	CQTYPDEICAWVVVTTR	1,EGCG2[C];	3.6	12.4	3.444	1.09E-02
P81827	CQTYPDEICAWVVVTTR	1,EGCG2[C];	3.6	12.4	3.444	1.09E-02
P83121	CQTYPDEICAWVVVTTR	1,EGCG2[C];	3.6	12.4	3.444	1.09E-02
P98158	YWVDAFFDK	0,Ethylphosphate[AnyN-term];	1.6	5.4	3.375	3.04E-02
P81828	PDEICAWVVVTTR	5,Cys->Tyr[C];	1.4	4.4	3.143	2.85E-02
P81827	PDEICAWVVVTTR	5,Cys->Tyr[C];	1.4	4.4	3.143	2.85E-02
P83121	PDEICAWVVVTTR	5,Cys->Tyr[C];	1.4	4.4	3.143	2.85E-02
P05544	TQGKIAELFSDLEER	0,Phosphogluconoylation[AnyN-term];	1	3	3.000	4.74E-02
P81828	PDEICAWVVVTTR	5,Nitrosyl[C];	2.8	7.6	2.714	3.95E-02
P81827	PDEICAWVVVTTR	5,Nitrosyl[C];	2.8	7.6	2.714	3.95E-02
P83121	PDEICAWVVVTTR	5,Nitrosyl[C];	2.8	7.6	2.714	3.95E-02
P81827	ICQTYPDEICAWVVVTTR	2,2-monomethylsuccinyl[C];	43.8	113.8	2.598	6.29E-03
P83121	ICQTYPDEICAWVVVTTR	2,2-monomethylsuccinyl[C];	43.8	113.8	2.598	6.29E-03
P02761	KTPEDGEYFVEYDGGNTFTILK	0,ISD_z+2_ion[AnyN-term];	5	12.4	2.480	2.39E-02

P13635	ALYSEYTDGTFTK	0,ISD_z+2_ion[AnyN-term];	4.4	10.4	2.364	3.56E-02
P81828	PDEICAWVVVTTR	5,Cys->Glu[C];	3.4	8	2.353	1.90E-02
P81827	PDEICAWVVVTTR	5,Cys->Glu[C];	3.4	8	2.353	1.90E-02
P83121	PDEICAWVVVTTR	5,Cys->Glu[C];	3.4	8	2.353	1.90E-02
P08932	NIPVDSPELK		2.4	5	2.083	4.86E-02
P08934	NIPVDSPELK		2.4	5	2.083	4.86E-02
Q68FP1	DSQEEEKTEALTSAK		11	20.4	1.855	3.84E-02
P01835	TDQDSKDSTYSMSSTLSLTK	5,Phospho[S];	1.2	2.2	1.833	3.41E-02
P01836	TDQDSKDSTYSMSSTLSLTK	5,Phospho[S];	1.2	2.2	1.833	3.41E-02
Q63041	GSIFNSGSHVLPLEQGK	0,Methyl[AnyN-term];	4.8	8.6	1.792	3.76E-02
P20759	TPPTMDTDGSYFLYSK	0,Phenylisocyanate_2H(5)[AnyN-term];	6.8	11.6	1.706	4.41E-02
P15684	SFPCFDEPAMK	4,Carbamidomethyl[C];	17.2	28.6	1.663	4.50E-02
P02761	IEENGSMRVFMQHIDVLENSLGFK	7,Oxidation[M];11,Oxidation[M];	151.8	249.8	1.646	1.58E-02
P02770	CCAEGDPPACYGTVLAEFQPLVEEPK	10,4-ONE[C];	10.2	6.8	0.667	4.34E-02
P01835	ERRDGVLDSVTDQDSK	0,Lys[AnyN-term];	5.2	3.2	0.615	3.41E-02
P07522	VTGNLHRADLGGMDVK	6,mTRAQ_13C(6)15N(2)[H];	4.6	2.8	0.609	3.67E-02
P02761	DVLENSLGFK	0,mTRAQ_13C(6)15N(2)[AnyN-term];	3	1.8	0.600	3.27E-02
P02761	VFMQHIDVLENSLGFK	0,Formyl[AnyN-term];	451.6	230.6	0.511	8.24E-03
P02770	IKLVQEVTDFAK	2,Phosphoguanosine[K];	3.8	1.6	0.421	1.96E-02
P02761	IDVLENSLGFK	0,BITC[AnyN-term];	19.2	7.8	0.406	9.24E-03
P81828	RCTSFDSTGFCHVGR	0,Unknown_306[AnyN-term]; 11,Carbamidomethyl[C];	5.8	2.2	0.379	2.88E-02
P12346	HQTVLENTNGK	7,Deamidated[N];	26	9	0.346	3.68E-02
P02761	TKDLSSDIK	0,ISD_z+2_ion[AnyN-term];	55	18.4	0.335	4.71E-02
P36375	EPADITDGVKVIDLPTEEPK	4,Cation_Fe[III][D];	1.8	0.6	0.333	3.27E-02
P36376	EPADITDGVKVIDLPTEEPK	4,Cation_Fe[III][D];	1.8	0.6	0.333	3.27E-02
P02761	IKENGECR	7,CarbamidomethylDTT[C];	12	3.2	0.267	4.50E-02
P02761	LNGDWFSIVVASNK	0,Formyl[AnyN-term];	3.8	1	0.263	8.64E-03
P02780	LVTIPICCYASGSGCSILDEVIR	0,Unknown_306[AnyN-term]; 7,Carbamidomethyl[C]; 15,Carbamidomethyl[C];	2.2	0.4	0.182	2.13E-02
Q9JHB9	LVTIPICCYASGSGCSILDEVIR	0,Unknown_306[AnyN-term]; 7,Carbamidomethyl[C]; 15,Carbamidomethyl[C];	2.2	0.4	0.182	2.13E-02
P02761	VFMQHIDVLENSLGFK	0,ICPL_13C(6)2H(4)[AnyN-term];	4.8	0.8	0.167	4.81E-03
P36373	DLMLLHLSQPADITDGVK	1,Dehydrated[D];	1.4	0.2	0.143	3.27E-02
P00758	DLMLLHLSQPADITDGVK	1,Dehydrated[D];	1.4	0.2	0.143	3.27E-02
P48199	VSRSFSIFSYATK	0,Unknown_250[AnyN-term];	6	0.6	0.100	3.67E-02
P20767	STPTLTVFPPSTEELQGNK	3,Pro->Pyrrolidinone[P];	12.2	1.2	0.098	4.37E-02
P01835	DGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTK	2,Gly->Pro[G];	1	0	0.000	3.41E-02
P01836	DGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTK	2,Gly->Pro[G];	1	0	0.000	3.41E-02
Q08420	DQPQITGLVLFR	0,Hex[AnyN-term];	1	0	0.000	3.41E-02

4 展望

实验采用大鼠自身对照、两次收尿时间上仅间隔一天，尽可能排除个体差异和自身生长发育对实验结果的干扰，因此即使样本量较小本研究结果仍能初步表明，大鼠交配当天与交配前尿液蛋白质组存在差异，且差异与受精、欣快反应相关；大鼠交配当天与交配隔天尿液蛋白质组具有显著差别，且差异蛋白大多与精子发生相关，其余差异蛋白虽现未在数据库中检索到与精子发生的相关性，但本研究结果暗示这些蛋白仍可能与精子发生相关，可以作为精子发生的靶点蛋白进一步研究。相对于尿液蛋白质组本身，蛋白质组的翻译后修饰变化更为显著，为开发更精准灵敏的尿液检测法用于机体状态监测、多种疾病早期筛查提供新的窗口，深入探究尿液蛋白质组翻译后修饰有重要科学意义与临床前景。

本研究展示了尿液蛋白质组在研究交配行为、精子发生过程的潜力，为探索精子发生异常男性致病机制的研究、靶点的发现和新的诊断手段提供了尿液蛋白质学方法。本研究结果表明，精液生精研究在收集精液进行研究的同时，实际上干扰了精子生精过程，而本研究中的尿蛋白质组学方法可以在不影响精子生精的情况下进行。进一步实验可以考虑扩大实验动物样本量或收集临床样本进行研究；同时也反映出尿液蛋白组的灵敏性，为尿液的探索开辟新的领域。

参考文献

1 Chocu S, Calvel P, Rolland AD, Pineau C. Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Syst Biol Reprod Med.* 2012, 58(4):179-90.

2 Gao Y. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery?. Sci China Life Sci. 2013;56(12):1145-1146.

3 Zhang J, Mu X, Xia Y, Martin FL, Hang W, Liu L, Tian M, Huang Q, Shen H. Metabolomic analysis reveals a unique urinary pattern in normozoospermic infertile men. *J Proteome Res.* 2014, 13(6):3088-99.

4 Wu J, Guo Z, Gao Y. Dynamic changes of urine proteome in a Walker 256 tumor-bearing rat model. *Cancer Medicine*. 2017;6:2713–2722.

5 Wei J, Ni N, Meng W, Gao Y. Early urine proteome changes in the Walker-256 tail-vein injection rat model. *Scientific Reports*. 2019;9:13804.

6 Liu Y, Shen Z, Zhao C, Gao Y. Urine proteomic analysis of the rat e-cigarette model. *PeerJ*. 2023;11:e16041.

7 Nielsen JE, Rolland AD, Rajpert-De Meyts E, Janfelt C, Jørgensen A, Winge SB, Kristensen DM, Juul A, Chalmel F, Jégou B, Skakkebaek NE. Characterisation and localisation of the endocannabinoid system components in the adult human testis. *Sci Rep.* 2019, 19;9(1):12866.

8 Gengyo-Ando K, Kage-Nakadai E, Yoshina S, Otori M, Kagawa-Nagamura Y, Nakai J, Mitani S. Distinct roles of the two VPS33 proteins in the endolysosomal system in Caenorhabditis elegans. *Traffic.* 2016, 17(11):1197-1213.

9 Li ZF, Qi HY, Wang JM, Zhao Z, Tan FQ, Yang WX. mTORC1/rpS6 and mTORC2/PKC regulate spermatogenesis through Arp3-mediated actin microfilament organization in Eriocheir sinensis. *Cell Tissue Res.* 2023, 393(3):559-575.

10 Mok KW, Chen H, Lee WM, Cheng CY. rpS6 regulates blood-testis barrier dynamics through Arp3-mediated actin microfilament organization in rat sertoli cells. An in vitro study. *Endocrinology.* 2015, 156(5):1900-13.

11 Shimada K, Kato H, Miyata H, Ikawa M. Glycerol kinase 2 is essential for proper arrangement

of crescent-like mitochondria to form the mitochondrial sheath during mouse spermatogenesis. *J Reprod Dev.* 2019, 65(2):155-162.
12 Sun X, Kovacs T, Hu YJ, Yang WX. The role of actin and myosin during spermatogenesis. *Mol Biol Rep.* 2011, 38(6):3993-4001.
13 Xiao X, Yang WX. Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2007, 8(7):498-506.
14 Wang L, Yan M, Wu S, Wu X, Bu T, Wong CKC, Ge R, Sun F, Cheng CY. Actin binding proteins, actin cytoskeleton and spermatogenesis - Lesson from toxicant models. *Reprod Toxicol.* 2020, 96:76-89.
15 Li Z, Lu J, Chen J, Pang Q, Nan R, Zhu Z. Expression and localization of guanine nucleotide-binding protein alpha S in the testis and epididymis of rams at different developmental stages. *Anim Reprod Sci.* 2017, 178:31-39.
16 Paulssen RH, Paulssen EJ, Gordeladze JO, Hansson V, Haugen TB. Cell-specific expression of guanine nucleotide-binding proteins in rat testicular cells. *Biol Reprod.* 1991, 45(4):566-71.
17 Wu Y, Shen C, Wu T, Huang X, Li H, Zheng B. Syntaxin binding protein 2 in sertoli cells regulates spermatogonial stem cell maintenance through directly interacting with connexin 43 in the testes of neonatal mice. Mol Biol Rep. 2022;49(8):7557-7566.
18 Karnik NS, Newman S, Kopf GS, Gerton GL. Developmental expression of G protein alpha subunits in mouse spermatogenic cells: evidence that G alpha i is associated with the developing acrosome. *Dev Biol.* 1992, 152(2):393-402.
19 Glassner M, Jones J, Kligman I, Woolkalis MJ, Gerton GL, Kopf GS. Immunocytochemical and biochemical characterization of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in mammalian spermatozoa. *Dev Biol.* 1991, 146(2):438-50.
20 Belardin LB, Del Giudice PT, Camargo M, et al. Alterations in the proliferative/apoptotic equilibrium in semen of adolescents with varicocele. J Assist Reprod Genet. 2016;33(12):1657-1664.
21 García-MacEdo R, Rosales AM, Hernández-Pérez O, Chavarría ME, Reyes A, Rosado A. Effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (V-type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit spermatozoa. *Andrologia.* 2001, 33(2):113-21.
22 Osses N, Pancetti F, Benos DJ, Reyes JG. Intracellular pH regulation in rat round spermatids. *Biol Cell.* 1997, 89(4):273-83.
23 Myers K, Somanath PR, Berryman M, Vijayaraghavan S. Identification of chloride intracellular channel proteins in spermatozoa. *FEBS Lett.* 2004, 566(1-3):136-40.
24 O'Bryan MK, Grima J, Mruk D, Cheng CY. Haptoglobin is a Sertoli cell product in the rat seminiferous epithelium: its purification and regulation. *J Androl.* 1997, 18(6):637-45.
25 Mancuso F, Calvitti M, Milardi D, Grande G, Falabella G, Arato I, Giovagnoli S, Vincenzoni F, Mancini F, Nastruzzi C, Bodo M, Baroni T, Castagnola M, Marana R, Pontecorvi A, Calafiore R, Luca G. Testosterone and FSH modulate Sertoli cell extracellular secretion: Proteomic analysis. *Mol Cell Endocrinol.* 2018, 476:1-7.
26 Sehgal L, Mukhopadhyay A, Rajan A, et al. 14-3-3 γ -Mediated transport of plakoglobin to the cell border is required for the initiation of desmosome assembly in vitro and in vivo. J Cell Sci. 2014;127(Pt 10):2174-2188.
27 Texada MJ, Simonette RA, Deery WJ, Beckingham KM. Tropomyosin is an interaction partner of the Drosophila coiled coil protein yuri gagarin. Exp Cell Res. 2011;317(4):474-487.

28 Zhang Z, Yang Y, Huang L, Chen L, Zhang G, Gong P, Ye S, Feng Y. Identification of potential candidate genes and regulatory pathways related to reproductive capacity in hypothalamus and pituitarium of male ducks (Anas platyrhynchos) by differential transcriptome analysis. J Anim Sci. 2023 Jan 3;101:skac363.
29 O'Donnell L, O'Bryan MK. Microtubules and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2014, 30:45-54.
30 Fujii Y, Fujita H, Yokota S. Synthesis of β-tubulin occurs within chromatoid body of round spermatids. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2017, 74(5):197-204.
31 Shao L, Fingerhut JM, Falk BL, Han H, Maldonado G, Qiao Y, Lee V, Hall E, Chen L, Polevoy G, Hernɑ́ndez G, Lasko P, Brill JA. Eukaryotic translation initiation factor eIF4E-5 is required for spermiogenesis in Drosophila melanogaster. Development. 2023 Feb 15;150(4):dev200477.
32 Schmid N, Flenkenthaler F, Stöckl JB, Dietrich KG, Köhn FM, Schwarzer JU, Kunz L, Luckner M, Wanner G, Arnold GJ, Fröhlich T, Mayerhofer A. Insights into replicative senescence of human testicular peritubular cells. Sci Rep. 2019 Oct 21;9(1):15052.
33 Hibi H, Ohori T, Yamada Y. DPP-IV inhibitor may affect spermatogenesis. Diabetes Res Clin Pract. 2011 Aug;93(2):e74-e75.
34 Dyrda K, Orzołek A, Ner-Kluza J, Wysocki P. Is stallion epididymal fluid phosphoproteome affected by the equine reproductive season? *Pol J Vet Sci.* 2021, 24(4):487-495.
35 Braun BC, Okuyama MW, Müller K, Dehnhard M, Jewgenow K. Steroidogenic enzymes, their products and sex steroid receptors during testis development and spermatogenesis in the domestic cat (Felis catus). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018, 178:135-149.
36 Yamamoto K, Ozakiya Y, Uno T. Localization of an Aldo-Keto Reductase (AKR2E4) in the Silkworm Bombyx mori (Lepidoptera: Bombycidae). *J Insect Sci.* 2017, 17(5):94.
37 Li XC, Schimenti JC. Mouse pachytene checkpoint 2 (trip13) is required for completing meiotic recombination but not synapsis. *PLoS Genet.* 2007, 3(8):e130.
38 Roig I, Dowdle JA, Toth A, de Rooij DG, Jasin M, Keeney S. Mouse TRIP13/PCH2 is required for recombination and normal higher-order chromosome structure during meiosis. *PLoS Genet.* 2010, 6(8):e1001062.
39 Wang SH, Cheng CY, Chen CJ, Chen HH, Tang PC, Chen CF, Lee YP, Huang SY. Changes in protein expression in testes of L2 strain Taiwan country chickens in response to acute heat stress. *Theriogenology.* 2014, 82(1):80-94.
40 Schmidt JA, de Avila JM, McLean DJ. Analysis of gene expression in bovine testis tissue prior to ectopic testis tissue xenografting and during the grafting period. *Biol Reprod.* 2007, 76(6):1071-80.
41 Riew TR, Kim S, Jin X, Kim HL, Hwang WC, Kang M, Yang ES, Lee MY, Min DS. Cellular and subcellular localization of endogenous phospholipase D6 in seminiferous tubules of mouse testes. Cell Tissue Res. 2021 Jul;385(1):191-205.
42 Kim S, Kim H, Lee Y, Hyun JW, Lee YH, Shin MK, Min do S, Shin T. The expression and cellular localization of phospholipase D isozymes in the developing mouse testis. J Vet Sci. 2007 Sep;8(3):209-12.
43 Dalmazzo A, Losano JDA, Angrimani DSR, Pereira IVA, Goissis MD, Francischini MCP, Lopes E, Minazaki CK, Blank MH, Cogliati B, Pereira RJG, Barnabe VH, Nichi M. Immunolocalisation and expression of oxytocin receptors and sex hormone-binding globulin in the testis and epididymis of dogs: correlation with sperm function. Reprod Fertil Dev. 2019 Aug;31(9):1434-1443.

44 de Santi F, Beltrame FL, Hinton BT, Cerri PS, Sasso-Cerri E. Reduced levels of stromal sex hormone-binding globulin and androgen receptor dysfunction in the sperm storage region of the rat epididymis. Reproduction. 2018 Jun;155(6):467-479. doi: 10.1530/REP-18-0014. PMID: 29748247.
45 Selva DM, Bassas L, Munell F, Mata A, Tekpetey F, Lewis JG, Hammond GL. Human sperm sex hormone-binding globulin isoform: characterization and measurement by time-resolved fluorescence immunoassay. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Nov;90(11):6275-82. doi: 10.1210/jc.2005-1192. Epub 2005 Aug 30. PMID: 16131577.
46 Eisa A, Dey S, Ignatious A, Nofal W, Hess RA, Kurokawa M, Kline D, Vijayaraghavan S. The protein YWHAE (14-3-3 epsilon) in spermatozoa is essential for male fertility. *Andrology.* 2021, 9(1):312-328.
47 Chapin RE, Wine RN, Harris MW, Borchers CH, Haseman JK. Structure and control of a cell-cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium. *J Androl.* 2001, 22(6):1030-52.
48 Xu GL, Ye XL, Vashisth MK, Zhao WZ. Correlation between PRDX2 and spermatogenesis under oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023, 656:139-145.
49 C. O'Flaherty, A. Boisvert, G. Manku, et al.Protective role of peroxiredoxins against reactive oxygen species in neonatal rat testicular gonocytes. *Antioxidants.* 2019, 9(1):32.
50 Li E, Guo Y, Ning Q, Zhang S, Li D. Research for the effect of octylphenol on spermatogenesis and proteomic analysis in octylphenol-treated mice testes. *Cell Biol Int.* 2011, 35(4):305-9.
51 Munier A, Serres C, Kann ML, Boissan M, Lesaffre C, Capeau J, Fouquet JP, Lacombe ML. Nm23/NDP kinases in human male germ cells: role in spermiogenesis and sperm motility? *Exp Cell Res.* 2003, 289(2):295-306.
52 Choi YJ, Cho SK, Hwang KC, Park C, Kim JH, Park SB, Hwang S, Kim JH. Nm23-M5 mediates round and elongated spermatid survival by regulating GPX-5 levels. *FEBS Lett.* 2009, 583(8):1292-8.
53 Bai FR, Wu QQ, Wu YJ, Hu YQ, Jiang ZX, Lv H, Qian WZ, Cai C, Wu JW. Germline FOXJ2 overexpression causes male infertility via aberrant autophagy activation by LAMP2A upregulation. Cell Death Dis. 2022 Jul 30;13(7):665.
54 Moreno RD. Differential expression of lysosomal associated membrane protein (LAMP-1) during mammalian spermiogenesis. Mol Reprod Dev. 2003 Oct;66(2):202-9.
55 Gao T, Zhao X, Liu C, Shao B, Zhang X, Li K, Cai J, Wang S, Huang X. Somatic Angiotensin I-Converting Enzyme Regulates Self-Renewal of Mouse Spermatogonial Stem Cells Through the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. Stem Cells Dev. 2018 Aug 1;27(15):1021-1032.
56 Shibata T, Bhat SA, Cao D, Saito S, Bernstein EA, Nishi E, Medenilla JD, Wang ET, Chan JL, Pisarska MD, Tourtellotte WG, Giani JF, Bernstein KE, Khan Z. Testicular ACE regulates sperm metabolism and fertilization through the transcription factor PPARγ. J Biol Chem. 2024 Jan;300(1):105486.
57 Pradhan BS, Bhattacharya I, Sarkar R, Majumdar SS. Pubertal down-regulation of Tetraspanin 8 in testicular Sertoli cells is crucial for male fertility. Mol Hum Reprod. 2020 Oct 1;26(10):760-772.
58 Cui Y, Zhu H, Zhu Y, Guo X, Huo R, Wang X, Tong J, Qian L, Zhou Z, Jia Y, Lue YH, Hikim AS, Wang C, Swerdloff RS, Sha J. Proteomic analysis of testis biopsies in men treated with injectable testosterone undecanoate alone or in combination with oral levonorgestrel as potential

male contraceptive. *J Proteome Res.* 2008, 7(9):3984-93.
59 Bayless DW, Davis CO, Yang R, Wei Y, de Andrade Carvalho VM, Knoedler JR, Yang T, Livingston O, Lomvardas A, Martins GJ, Vicente AM, Ding JB, Luo L, Shah NM. A neural circuit for male sexual behavior and reward. *Cell*. 2023;186(18):3862-3881.e28.
60 Shao G, Cao Y, Chen Z, Liu C, Li, Chi H, Dong MQ. How to use open-pFind in deep proteomics data analysis?- A protocol for rigorous identification and quantitation of peptides and proteins from mass spectrometry data. *Biophysics Reports*. 202;7(3):207-226.